

PCT/JP97/03397

日 本 国 特 許 庁

31.10.97

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

| | |
|-------|-------------|
| REC'D | 19 DEC 1997 |
| WIPO | PCT |

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1996年12月26日

出 願 番 号

Application Number:

平成 8年特許願第356416号

出 願 人

Applicant (s):

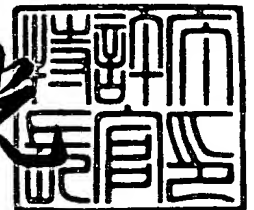
寶酒造株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1997年12月 5日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平09-3100216

【書類名】 特許願

【整理番号】 1-961221-1

【提出日】 平成 8年12月26日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光殿

【国際特許分類】 A61K 31/185 ADS
A61K 31/725 ADS
A23L 1/00
A23L 2/00

【発明の名称】 アポトーシス誘発剤

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 小山 信人

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 巽 容子

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 佐川 裕章

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 猪飼 勝重

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代表者】 大宮 久

【代理人】

【識別番号】 100078503

【弁理士】

【氏名又は名称】 中本 宏

【代理人】

【識別番号】 100087022

【弁理士】

【氏名又は名称】 井上 昭

【代理人】

【識別番号】 100089428

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉嶺 桂

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 委任状 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アポトーシス誘発剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物、微生物又は動物由来のアポトーシス誘発化合物を有効成分とすることを特徴とするアポトーシス誘発剤。

【請求項2】 請求項1記載のアポトーシス誘発剤の製造方法において、植物、微生物又は動物からアポトーシス誘発化合物を有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする請求項1記載のアポトーシス誘発剤の製造方法。

【請求項3】 請求項1記載のアポトーシス誘発剤の製造方法において、植物、微生物又は動物を、酸又はアルカリで処理する工程、及びアポトーシス誘発化合物を有機溶媒抽出する工程を包含することを特徴とする請求項1記載のアポトーシス誘発剤の製造方法。

【請求項4】 植物、微生物又は動物由来のアポトーシス誘発化合物を有効成分とすることを特徴とする制がん剤。

【請求項5】 請求項4記載の制がん剤の製造方法において、植物、微生物又は動物からアポトーシス誘発化合物を有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする請求項4記載の制がん剤の製造方法。

【請求項6】 請求項4記載の制がん剤の製造方法において、植物、微生物又は動物を、酸又はアルカリで処理する工程、及びアポトーシス誘発化合物を有機溶媒抽出する工程を包含することを特徴とする請求項4記載の制がん剤の製造方法。

【請求項7】 植物、微生物又は動物由来のアポトーシス誘発化合物を含有、添加及び／又は希釈してなることを特徴とする食品又は飲料。

【請求項8】 請求項7記載の食品又は飲料の製造方法において、植物、微生物又は動物からアポトーシス誘発化合物を有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする請求項7記載の食品又は飲料の製造方法。

【請求項9】 請求項7記載の食品又は飲料の製造方法において、植物、微生物又は動物を、酸又はアルカリで処理する工程、及びアポトーシス誘発化合物を有機溶媒抽出する工程を包含することを特徴とする請求項7記載の食品又は飲料

料の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、健康増強に有用な植物、微生物又は動物由来の生理活性物質を有効成分とし、医薬として有用なアポトーシス誘発剤、制がん剤、該生理活性物質を含有する食品又は飲料、及びこれらの製造方法に関する。

【0002】

【従来技術】

近年、細胞組織の死に関し、アポトーシス (apoptosis、アポプトーシスともいう；自爆死あるいは細胞自滅) という様式が注目されている。

このアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組込まれている死であると考えられている。すなわち何らかの外部的又は内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化され、この遺伝子を基にプログラム死遺伝子タンパク質が生合成され、生成したプログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。

このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現せしめることができれば、不要若しくは病原細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて意義深いものである。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、植物、微生物又は動物由来のアポトーシスを誘発する作用を有する安全性の高い抽出画分を開発し、該画分を含有するアポトーシス誘発剤、制がん剤、該画分を構成成分とする食品又は飲料、及びそれらの製造方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明はアポトーシス誘発剤に関し、植物、微生物又は動物由来のアポトーシス誘発化合物を有効成分とすることを特徴と

する。

本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明のアポトーシス誘発剤の製造方法に関し、アポトーシス誘発剤の製造方法において、植物、微生物又は動物からアポトーシス誘発化合物を有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする。

本発明の第3の発明は制がん剤に関し、植物、微生物又は動物由来のアポトーシス誘発化合物を有効成分とすることを特徴とする。

本発明の第4の発明は、本発明の第3の発明の制がん剤の製造方法に関し、制がん剤の製造方法において、植物、微生物又は動物からアポトーシス誘発化合物を有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする。

本発明の第5の発明は食品又は飲料に関し、植物、微生物又は動物由来のアポトーシス誘発化合物を含有、添加及び／又は希釈してなることを特徴とする。

本発明の第6の発明は、本発明の第5の発明の食品又は飲料の製造方法に関し、食品又は飲料の製造方法において、植物、微生物又は動物からアポトーシス誘発化合物を有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする。

【0005】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明において使用できる植物、微生物又は動物としては、アポトーシス誘発作用を有する化合物を含有すれば良く、特に限定はないが、植物としては、例えば、双子葉植物、単子葉植物、藻類、微生物としては担子菌類、子のう菌類、酵母、糸状菌、例えば麹菌、細菌、例えば納豆菌、乳酸菌等、動物としては脊椎動物又は無脊椎動物が例示される。

【0006】

本発明において、植物、微生物又は動物由来のアポトーシス誘発作用を有する化合物は有機溶媒、例えばヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、又は親水性有機溶媒で抽出され、例えば含水エタノールによる抽出工程を包含する製造方法により、簡便に製造することができる。食品又は飲料に使用する場合、好適には抽出条件として、有機溶媒、特に親水性有機溶媒、例えば10～95%、好ましくは20～80%エタノール水溶液で、通常数分～数日間、好ましくは数十分から

数十時間、通常10℃～70℃、好ましくは20～60℃で抽出することにより効率よくアポトーシス誘発化合物が抽出される。また、有機溶媒、特に親水性有機溶媒で抽出する前に、酸、又はアルカリで処理することにより、更に効率よくアポトーシス誘発化合物が抽出される。精製に際しては、アポトーシス誘発化合物の理化学的性質、又はアポトーシス誘発作用、制がん作用等の生理活性を指標にして精製しても良い。

【0007】

本発明のアポトーシス誘発化合物の例としては植物、微生物又は動物由来の脂肪酸又は脂肪酸含有化合物があり、脂肪酸は飽和及び／又は不飽和脂肪酸であり、脂肪酸含有化合物としては糖脂質、リン脂質、糖と脂肪酸よりなる化合物、糖脂質と糖類及び／又はタンパク質との複合体等が包含される。

【0008】

上記方法で得られた本発明で用いられる物質は天然より得られる安全性の高い物であり、食品及び／又は飲料用として特に有用である。

【0009】

本発明のアポトーシス誘発化合物は薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤であることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

【0010】

本発明のアポトーシス誘発剤は、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分であるアポトーシス誘

発性を有する化合物を、希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

【0011】

本発明のアポトーシス誘発剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

【0012】

本発明のアポトーシス誘発剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当り1～2000mg、好ましくは10～500mgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0013】

制がん作用を有する、本発明のアポトーシス誘発化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば制がん剤を製造することができる。制がん剤の製造は前記方法に準じ行うことができる。一般的には、本発明のアポトーシス誘発化合物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤であることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

制がん剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、前記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、前記アポ

トーシス誘発剤に準じ使用すれば良い。

制がん剤としては、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

【0014】

制がん剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当り1～1000mg、好ましくは10～200mgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0015】

本発明の薬剤は感染症、免疫機能の低下又は昂進あるいはがん疾患、ウイルス性疾患等の治療剤として用いることができる。また本発明のアポトーシス誘発剤により提供されるアポトーシス誘発方法は生体防御機構、免疫機能あるいはがん、ウイルス性疾患等との関係の研究、アポトーシス誘発阻害剤の開発等に有用である。特に、食品として長い歴史を有する植物、微生物又は動物より調製した本発明のアポトーシス誘発化合物は、経口投与の場合において、極めて安全性の高いものである。また本発明の化合物を含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は当然安全性は高く、そのアポトーシス誘発作用、アポトーシス作用による制がん作用により、消化器系がん等の予防、治療に極めて有用である。

【0016】

本発明の食品又は飲料とは、特に限定はないが、例えば穀類、いも及びデンプン類、砂糖及び甘味料類、菓子類、油脂類、種実類、豆類、魚介類、獣鳥鯨肉類、卵類、乳類、野菜類、果実類、きのこ類、藻類、嗜好飲料類（非アルコール飲料、アルコール飲料）、調味料、醸造物（味噌、醤油、食酢）、酒類及び香辛料類並びに加工食品類が挙げられる。

【0017】

本発明の食品又は飲料の製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料に本発明の植物、微生物又は動物由来のアポトーシス誘発化合物が含有されていれば良い。

調理及び加工においては、調理、加工後にアポトーシス誘発性を有する本発明の化合物が含有されていれば良い。

すなわち調理・加工前、調理・加工時、更には調理・加工後にアポトーシス誘発性を有する本発明の化合物を添加してもよいし、調理及び加工品やその材料を、本発明のアポトーシス誘発化合物に添加し、該化合物を希釈してもよい。

【0018】

次に食品又は飲料の製造においては、任意の工程でアポトーシス誘発化合物を含有させれば良く、また添加してもよいし、食品又は飲料やその原料を、アポトーシス誘発化合物に添加し、又は希釈してもよい。また、添加は1回又は数回に渡って行ってもよい。したがって、簡便にアポトーシス誘発作用を有する食品又は飲料を製造することができる。いずれの工程を経た場合も、アポトーシス誘発性を有する、本発明のアポトーシス誘発化合物を含有する食品又は飲料、本発明のアポトーシス誘発化合物を添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は本発明の食品又は飲料と定義される。

【0019】

本発明のアポトーシス誘発作用を有する化合物の食品中の含有量は特に制限されず、その官能と生理活性の点より適宜選択できるが、例えばアポトーシス誘発化合物の含有量は食品100部当り0.001部以上、食品としての官能、アポトーシス誘発作用の面及びコストの面からは好ましくは0.005～10部、更に好ましくは0.01～1部である。

【0020】

本発明のアポトーシス誘発作用を有する化合物の飲料中の含有量は特に制限されず、その官能と生理活性の点より適宜選択できるが、例えばアポトーシス誘発化合物の含有量は飲料100部当り0.001部以上、飲料としての官能、アポトーシス誘発作用の面及びコストの面からは好ましくは0.005～10部、更

に好ましくは0.01～1部である。なお、本明細書において部は重量部を意味する。

【0021】

本発明の食品又は飲料としては、本発明のアポトーシス誘発性を有する化合物が含有、添加及び／又は希釈されていれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ゾル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

【0022】

本発明の食品又は飲料は生理活性を有する本発明の化合物を多量に含有し、これらを摂取することにより発がん予防、がん抑制効果、異常増殖細胞の抑制、抗潰瘍効果、アルツハイマー病予防効果等、生体の恒常性（ホメオスタシス）維持機能を有する健康食品又は飲料であり、特に胃腸健康保持に有用な食品又は飲料である。

本発明の化合物は天然由来であり、食品又は飲料への使用は極めて安全性に優れたものである。

【0023】

本発明のアポトーシス剤を使用するアポトーシス誘発方法は生体防御機構、免疫機能あるいはがん、ウイルス性疾患等との関係の研究、アポトーシス誘発阻害剤の開発等に有用である。特に、食用植物又は微生物中の本発明の化合物は食品として長い歴史を有するものであり、これらから調製した本発明の抽出物は、経口投与の場合において、極めて安全性の高いものである。

【0024】

【実施例】

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における％は重量％を意味する。

【0025】

実施例 1

特公平6-34660号公報記載の方法に従って、*Lyophyllum ulmarium* M-81

71 (FERM BP-1415) を栽培し、リオフィラム ウルマリウム子実体 (以下、しめじと略す) を調製した。なおこの子実体は「やまびこほんしめじ」として市販されている子実体と同一物である。

しめじの凍結乾燥粉碎物 5 g を 250 ml の 75 % エタノール水溶液に懸濁し、室温で 2 時間振とうした後、遠心分離で上清と沈殿に分離し、抽出液を得た。この抽出液を、ロータリーエバポレーター (30℃) で濃縮乾固し、20 ml の 75 % エタノール水溶液に再溶解して、しめじ抽出濃縮物を得た。このしめじ抽出濃縮物の一部に 1/2 体積の水、しめじ抽出濃縮物と等量のクロロホルムを添加し懸濁した後に、静置して上層と下層に分画した。分画した上層、下層それぞれを濃縮乾固した後、分画に用いたしめじ抽出濃縮物の 1/2 量の 75 % エタノール水溶液に再溶解して、それぞれの画分のアポトーシス誘発活性を測定した。それぞれの画分の 75 % エタノール水溶液再溶解物の希釈系列を 75 % エタノール水溶液で作製した。各希釈液 5 μ l を 96 穴マイクロタイタープレートに入れ、乾燥させた後、そこに 5000 個の HL-60 細胞 (ATCC CCL-240) を含む 10 % 牛胎児血清含有 RPMI 1640 培地 100 μ l を加え、5 % 炭酸ガス存在下、37℃ で 48 時間培養した。細胞の形態を光学顕微鏡で観察した後、5 mg/ml の 3- (4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル) -2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT; シグマ社製) リン酸緩衝食塩水溶液 10 μ l を加えて更に 4 時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。また、0.04 N HCl 含有 2-プロピルアルコール 100 μ l を加えてよくかくはんし、590 nm における吸光度を測定してこれを細胞増殖とした (MTT 法)。その結果、下層からの上記画分の 20 倍希釈液で細胞は死滅し、強いアポトーシス誘発活性が認められた。そこで、このしめじ抽出濃縮物を同様の操作で、クロロホルム分画を行い、75 % エタノール水溶液ではなく、シリカゲルカラムクロマト用の移動相に再溶解した後、シリカゲルカラムクロマトを行った。シリカゲルカラムクロマトは、移動相として、クロロホルム:メタノール:水 = 65:25:4 (条件 1)、クロロホルム:メタノール = 65:25 (条件 2) の 2 条件でそれぞれ独立して行った。それぞれのシリカゲルカラムクロマトのフラクションを濃縮乾固し、最初の液量の 1/20 量の 75 % エタノール水

溶液に再溶解して、前述と同様のMTT法でアポトーシス誘発活性を測定し、活性が確認された画分をTLC（クロロホルム：メタノール：水＝65：25：4）で分析した。その結果、条件1では、プリムリン試薬に反応するスポット（脂質）、ニンヒドリン試薬に反応するスポット（アミノ基）、オルシノール硫酸に反応するスポット（糖）、デイトマー試薬に反応するスポット（リン脂質）が存在するA画分と、プリムリン試薬に反応するスポット、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するB画分に活性が存在した。条件2では、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するC画分と、プリムリン試薬に反応するスポット、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するD画分と、プリムリン試薬に反応するスポット、ニンヒドリン試薬に反応するスポット、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するE画分に活性が存在した。更に、条件1のA画分を集めて濃縮乾固後、移動相に溶解してシリカゲルカラムクロマトを行った。移動相として、クロロホルム：メタノール＝95：5（条件3）を用いた。前回と同様に各フラクションをMTT法でアッセイし、活性が確認された画分をTLC（クロロホルム：メタノール＝95：5）で分析した。その結果、条件3においては、プリムリン試薬に反応するスポットが存在するF画分と、プリムリン試薬に反応するスポット、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するG画分と、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するH画分に活性が存在した。

【0026】

実施例2

実施例1記載のしめじの凍結乾燥粉碎物1gを50mlの75%エタノール水溶液、及び50%エタノール水溶液に懸濁し、37℃で2時間振とうした後、遠心分離で上清と沈殿に分離し、各々の抽出液を得た。これらの抽出液を、ロータリーエバポレーター（30℃）で濃縮乾固し、各々、8mlの75%エタノール水溶液、50%エタノール水溶液に再溶解して、しめじ抽出濃縮物を得た。これらのしめじ抽出濃縮物の希釈系列をそれぞれ、75%エタノール水溶液、50%エタノール水溶液で作製した。これらの各希釈液を用い、前述のMTT法でアッセイしたところ、75%エタノール水溶液、50%エタノール水溶液抽出物は10倍希釈しても細胞死が認められ、アポトーシス誘導活性が確認され、75%エ

タノール水溶液、50%エタノール水溶液両抽出条件において、アポトーシス誘発活性物質が抽出されていることが、確認された。更に、これらのしめじ抽出濃縮物を用いて、アポトーシス誘発活性を測定した。すなわち、上記抽出濃縮液25 μ lを試料とし、エタノールを揮発せしめた後に、牛胎児血清10%を含有するRPMI 1640培地にて培養したHL-60細胞 2.5×10^5 個/4.5mlに添加し、37℃、48時間培養した。同時に対照試料として、蒸留水及びアポトーシス誘発活性を有することが判っているアクチノマイシンD溶液(10 μ g/ml)を添加した。光学顕微鏡下で、アポトーシス小体の形成、細胞の収縮、核の凝縮を肉眼観察し、生細胞数をカウントした。これらの現象が観察され、生細胞数の減少が認められるものを、アポトーシス誘発活性有りと判断した。その結果、75%エタノール水溶液、50%エタノール水溶液抽出物にアポトーシス誘発化合物が存在することが確認された。

【0027】

実施例3

コンブからのアポトーシス誘発活性を有する抽出液の調製

市販の乾燥ガゴメコンブをミキサーで粉碎した。このコンブ粉末0.5gに対して25mlの①60mM HCl、②1M 酢酸、③1% NaHCO₃、④1% Na₂CO₃、⑤1% Na₂CO₃、⑥クロロホルム：メタノール=2：1、⑦75%エタノール水溶液、⑧0.1% SDS、又は⑨0.01% SDSを加え、①、②、③、④、及び⑦は60℃で、それ以外は37℃で3時間抽出した。なお、今後①～⑨の溶液を一次抽出液と呼ぶ。①と②はNa₂CO₃で、④と⑤はHClで中和し、それ以外はそのまま遠心分離した後、以下の操作を行った。A. 沈殿に25mlの75%エタノール水溶液を加え、60℃で2時間抽出し、遠心上清を減圧下濃縮乾固した後1mlの75%エタノール水溶液に溶解する。B. 10mlの上清に30mlのエタノールを加えて混合し、遠心上清を減圧下濃縮乾固した後0.4mlの75%エタノール水溶液に溶解する。C. 上清を減圧下乾固し、1mlの75%エタノール水溶液に溶解する。こうして得られた抽出液を75%エタノール水溶液で希釈し、96穴マイクロタイタープレートのウェルに5 μ lずつ加えて風乾した後、5000個のHL-60細胞を含

む10%牛胎児血清含有RPMI1640培地100 μ lを加え、実施例1に記載のMTT法によりアポトーシス誘発活性を測定した。その結果、表1に示す結果が得られた。すなわち、表1は抽出方法とアポトーシス誘発活性の関係を示す表であり、表1中の数字はアポトーシス誘発活性を有していた希釈液の希釈倍率を示す。75% エタノール水溶液で抽出する前に酸性(①A.)又はアルカリ性(③A.、④A.、⑤A.)の一次抽出液で粉末コンブを処理することによって無処理区(⑦C.)に比べて2倍のアポトーシス誘発活性物質が抽出された。

【0028】

【表1】

表1

| 一次抽出液 | A. | B. | C. |
|-------|----|-----|----|
| ① | 8 | < 2 | |
| ② | 4 | 4 | |
| ③ | 8 | — | |
| ④ | 8 | 4 | |
| ⑤ | 8 | 2 | |
| ⑥ | | | 8 |
| ⑦ | | | 4 |
| ⑧ | | 2 | |
| ⑨ | | < 2 | |

【0029】

実施例4

キノコからのアポトーシス誘発活性物質の抽出

(1) ヒラタケ及びマッシュルーム抽出物のアポトーシス誘発活性

市販のヒラタケとマッシュルーム各々の凍結乾燥粉末0.5gに25mlの75%エタノール水溶液を加え、37℃で2時間抽出した。遠心上清を減圧下濃縮。

乾固し、1 ml の 75 % エタノール水溶液に溶解した後、75 % エタノール水溶液で希釈した。希釈液 1 μ l に 5000 個の HL-60 細胞を含む 10 % 牛胎児血清含有 RPMI 1640 培地 100 μ l を添加し、実施例 1 に記載の MTT 法でアポトーシス誘発活性を測定した。その結果、ヒラタケの 2 倍希釈液とマッシュルームの非希釈液に活性が見られた。

【0030】

(2) 生しめじ抽出物のアポトーシス誘発活性

40 g の実施例 1 記載のしめじに 0 (0%)、50 (25%)、100 (50%)、又は 150 ml (75%) のエタノールと 160、110、60、又は 10 ml の水を加えてミキサーで 30 秒間ホモジナイズし、室温で 2 時間振とうした後、ろ過によって抽出液を得た。この抽出液を 75 % エタノール水溶液で希釈し、実施例 1 に記載の MTT 法でアポトーシス誘発活性を測定した。その結果、0、25、50 % エタノール水溶液抽出物の 2 倍希釈液と 75 % エタノール水溶液抽出物の 5 倍希釈液にアポトーシス誘発活性が見られた。

前記しめじを 3 ~ 5 mm 角に裁断したもの 40 g に 50 (25%)、100 (50%)、又は 150 ml (75%) のエタノールと 110、60、又は 10 ml の水を加え、室温で 2 時間振とうした後、ろ過によって抽出液を得た。この抽出液を 75 % エタノール水溶液で希釈し、実施例 3 と同様の方法でアポトーシス誘発活性を測定した。その結果、25 % エタノール抽出物の原液 (非希釈) と 50 % 及び 75 % エタノール水溶液抽出物の 2 倍希釈液にアポトーシス誘発活性が見られた。

【0031】

(3) シイタケ抽出物のアポトーシス誘発活性-1

市販のシイタケを凍結乾燥して粉碎した粉末を表 2 に示す条件で 2 時間抽出した。

【0032】

【表 2】

表2

| | シイタケ 粉末(g) | エタノール 濃度(%) | 抽出液量(ml) | 抽出温度 (℃) |
|---|---------------|----------------|----------|-------------|
| ① | 0.5 | 25 | 20 | 60 |
| ② | 0.5 | 75 | 10 | 室温 |
| ③ | 0.5 | 50 | 10 | 室温 |
| ④ | 0.5 | 75 | 25 | 室温 |

【0033】

抽出後遠心によって不溶物を除き、上清を減圧下濃縮乾固した後抽出液と同じ濃度のエタノール水溶液 1 ml に溶解した。この液を 75 %エタノール水溶液で希釈し、実施例 3 の方法でアポトーシス誘発活性を測定したところ、①の 10 倍希釈液、②の 2 倍希釈液、③の 5 倍希釈液、及び④の 5 倍希釈液に活性が見られた。

【0034】

(4) シイタケ抽出物のアポトーシス誘発活性-2

市販のシイタケを傘と軸に分け、別々に凍結乾燥したのち粉碎し、その粉末 0.5 g に 25 ml の 75 %エタノール水溶液を加えて 37℃で 2 時間抽出した。遠心上清を減圧下濃縮乾固し、1 ml の 75 %エタノール水溶液に溶解した後、75 %エタノール水溶液で希釈した。この希釈液のアポトーシス誘発活性を実施例 1 記載の MTT 法で測定したところ、傘抽出液の 2 倍希釈液と軸抽出液の 20 倍希釈液にアポトーシス誘発活性が見られた。中国産干しシイタケの上級品と、中級品の傘と軸についてもミキサーで粉碎して同様の抽出とアポトーシス誘発活性の測定を行ったところ、上級品抽出液、中級品傘抽出液、及び中級品軸抽出液の各々 5 倍希釈液に活性が見られた。

【0035】

実施例 5

野菜抽出物のアポトーシス誘発活性

市販のキャベツ、ナスの皮、ナスの皮を除いた部分、及びハウレンソウの葉を凍結乾燥した後粉碎し、実施例4-(4)と同様の方法で抽出とアポトーシス誘発活性の測定を行ったところ、キャベツ抽出液、ナスの皮抽出液、及びハウレンソウの葉抽出液の2倍希釈液とナスの皮を除いた部分抽出液の5倍希釈液に活性が見られた。

【0036】

【発明の効果】

本発明により、植物、微生物又は動物由来の強いアポトーシス誘発作用を有する化合物を含有するアポトーシス誘発剤が提供され、そのアポトーシス誘発作用による制がん剤も提供される。このアポトーシス誘発は有機溶媒、特に親水性有機溶媒により効率よく抽出され、簡便に本発明の有効成分を得ることができる。溶媒抽出の前に、酸、又はアルカリ処理を行うことにより、抽出効率を向上させることが可能である。またその疎水性の度合いにより、抽出溶媒の極性が選択できる。特に食用植物、微生物又は動物から抽出及び／又は精製した本発明のアポトーシス誘発化合物を含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は日常的に摂取することにより健康が増進し、健康食品として極めて有用なものである。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アポトーシス誘発剤、制がん剤、あるいはそれらを構成成分とする食品又は飲料、及びそれらの製造方法を提供する。

【解決手段】 植物、微生物又は動物由来の強いアポトーシス誘発化合物を有効成分とするアポトーシス誘発剤又は制がん剤。あるいは該アポトーシス誘発化合物を含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料。該アポトーシス誘発化合物の例には、脂肪酸、あるいは糖脂質、リン脂質、糖と脂肪酸よりなる化合物、又は糖脂質と糖類及び／若しくはタンパク質との複合体等の脂肪酸含有化合物がある。

【選択図】 なし

委 任 状

平成 8 年 / 2 月 24 日

私は、識別番号 100078503 弁理士 中 本 宏氏、
識別番号 100087022 弁理士 井 上 昭氏、
識別番号 100089428 弁理士 吉 嶺 桂氏、
をもって代理人として下記事項を委任します。

記

1. 特許出願

に関する一切の件

2. 上記出願に関する放棄又は取下げ
3. 上記出願に関する出願審査等の請求又は申立ての取下げ
4. 上記出願に関する優先審査等の申請又は申立ての取下げ
5. 上記出願に関する出願人名義変更
6. 上記出願に基づく特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の優先権主張並びにその取下げ
7. 特許法第46条第1項及び第2項の出願変更又は実用新案法第10条第1項及び第2項の出願変更
8. 特許法第121条第1項の審判の請求又はその取下げ
9. 上記事項を処理するための復代理人の選任及び解任

住 所

京都市伏見区竹中町609番地

氏 名

寶酒造株式会社

代表取締役 大 宮 久



【書類名】 職権訂正データ
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 591038141
 【住所又は居所】 京都府京都市伏見区竹中町609番地
 【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100078503
 【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目8番7号 とみたやビル7
 階 吉嶺特許事務所

【氏名又は名称】 中本 宏

【代理人】 申請人

【識別番号】 100087022
 【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目8番7号 とみたやビル7
 階 吉嶺特許事務所

【氏名又は名称】 井上 昭

【代理人】 申請人

【識別番号】 100089428
 【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目8番7号 とみたやビル7
 階 吉嶺特許事務所

【氏名又は名称】 吉嶺 桂

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591038141]

1. 変更年月日 1991年 2月 4日
[変更理由] 新規登録
住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地
氏 名 寶酒造株式会社